

none	none	none
------	------	------

© EPODOC / EPO

TI - THERAPEUTIC AGENT FOR CHRONIC ARTHRORHEUMATISM
 PN - JP10029942 A 19980203
 AP - JP19970096378 19970401
 OPD - 1996-04-02
 PR - JP19970096378 19970401; JP19960102047 19960402
 PA - ICHIKAWA YOICHI
 IN - KIKUKAWA TADAHIRO; ICHIKAWA YOICHI; YAMADA HIDEHIRO
 IC - A61K31/557 ; A61K9/107 ; A61K47/14

© WPI / DERWENT

TI - Rheumatoid arthritis treating agent - contains prostaglandin=E1
 AB - J10029942 New rheumatoid arthritis treating agent comprises prostaglandin E1 (PGE1) as active ingredient.
 - Also claimed are i) rheumatoid arthritis treating agent containing PGE1 in the form of fat emulsion; ii) fat emulsion whose average particle size is less than 1 μ m containing (a) PGE1 (0.001-0.01 % (w/v)); (b) at least one fat emulsion base selected from plant oil, triglyceride of 6-12C medium chain fatty acid and di- and monoglyceride of 6-18C fatty acid; (c) emulsifier of phospholipid (0.6-2.4 % (w/v)); (d) isotonic agent of glycerol; and (e) water; iii) rheumatoid arthritis treating agent containing PGE1 and phosphodiesterase inhibitor; iv) phosphodiesterase inhibitor used as intensifier for PGE1.
 - USE - The agent is effective for the treatment of rheumatoid arthritis.
 - ADVANTAGE - The activity of the rheumatoid arthritis treating agent is intensified by the combined use of phosphodiesterase inhibitor, which keeps the high cyclic AMP concn. in cells. The agent does not cause side effects.
 - (Dwg. 7/17)
 PN - JP10029942 A 19980203 DW199815 A61K31/557 013pp
 OPD - 1996-04-02
 PR - JP19960102047 19960402
 PA - (ICHI-I) ICHIKAWA Y
 IC - A61K9/107 ; A61K31/557 ; A61K47/14
 AN - 1998-163668 [15]

© PAJ / JPO

TI - THERAPEUTIC AGENT FOR CHRONIC ARTHRORHEUMATISM
 AB - PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a new type therapeutic agent for chronic arthrorheumatism, free from adverse effects by using a specific prostaglandin, especially in a form of fat emulsion as an active ingredient.
 - SOLUTION: This therapeutic agent contains prostaglandin E1 as an active ingredient. Targeting therapy is made possible and excellent anti rheumatics is obtained by emulsifying prostaglandin E1 in a form of fat emulsion. Further, action of the prostaglandin E1 is synergically enhanced by combinedly using the prostaglandin E1 with a phosphodiesterase inhibitor such as pentoxifylline in a low concentration. The prostaglandin E1-containing fat emulsion preferably contains prostaglandin E1 [in an amount of 0.001-0.01% (W/V)], plant oil, at least one kind of fat emulsion base (in an amount of 5-20%) selected from a 6-12C middle chain fatty acid triglyceride and 6-18C fatty acid di- and monoglyceride, an emulsifier of phospholipid (in an amount of 0.6-2.4%) and an isotonicizing agent of glycerin and water and has $\leq 1 \mu$ m average particle diameter.
 PN - JP10029942 A 19980203
 AP - JP19970096378 19970401
 PA - ICHIKAWA YOICHI
 IN - YAMADA HIDEHIRO; ICHIKAWA YOICHI; KIKUKAWA TADAHIRO

none	none	none
------	------	------

none

none

none

I - A61K31/557 ;A61K9/107 ;A61K47/14

none

none

none

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平10-29942

(43) 公開日 平成10年(1998) 2月3日

(51) Int.Cl. ⁸	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
A 6 1 K 31/557 9/107 47/14	ABG		A 6 1 K 31/557 9/107 47/14	ABG E C G Z
審査請求 未請求 請求項の数 8 F D (全 13 頁)				

(21) 出願番号	特願平9-96378	(71) 出願人	596056597 市川 陽一 東京都杉並区阿佐ヶ谷南2-4-17
(22) 出願日	平成9年(1997) 4月1日	(72) 発明者	山田 秀裕 神奈川県川崎市多摩区南生田3-8-11
(31) 優先権主張番号	特願平8-102047	(72) 発明者	市川 陽一 東京都杉並区阿佐ヶ谷南2-4-17
(32) 優先日	平8(1996) 4月2日	(72) 発明者	菊川 忠裕 埼玉県川越市古谷上5327 B-104
(33) 優先権主張国	日本 (J P)	(74) 代理人	弁理士 草間 攻

(54) 【発明の名称】 慢性関節リウマチ治療剤

(57) 【要約】

【課題】 慢性関節リウマチの病態を抑制する慢性関節リウマチに対する治療剤を提供する。

【解決手段】 プロスタグランジンE1 (PGE1) を有効成分とする慢性関節リウマチ治療剤、ならびにPGE1を脂肪乳剤の形態にした慢性関節リウマチ治療剤。特に、(a) プロスタグランジンE1 (PGE1) : 0.001~0.01% (w/v)、(b) 植物油、炭素数6~12個の中鎖脂肪酸のトリグリセリドならびに炭素数6~18個の脂肪酸のジ-およびモノグリセリドから選ばれる少なくとも1種の脂肪乳剤基剤: 5~20% (w/v)、(c) リン脂質である乳化剤: 0.6~2.4% (w/v)、(d) グリセリンである等張化剤、および(e) 水を含有し、平均粒子径が1ミクロン以下である慢性関節リウマチ治療剤としてのプロスタグランジンE1含有脂肪乳剤。さらにはこれらの慢性関節リウマチ治療剤とホスホジエステラーゼ阻害剤を併用することにより効果が増強される治療剤単位。

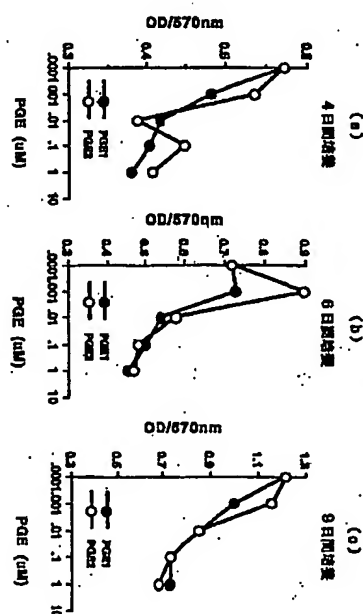


図1: 慢性関節リウマチに対する効果

【特許請求の範囲】

【請求項1】 プロスタグランジンE1 (PGE1) を有効成分とする慢性関節リウマチ治療剤。

【請求項2】 プロスタグランジンE1 (PGE1) を脂肪乳剤の形態にした慢性関節リウマチ治療剤。

【請求項3】 (a) プロスタグランジンE1 (PGE1) : 0.001~0.01% (w/v)、(b) 植物油、炭素数6~12個の中鎖脂肪酸のトリグリセリドならびに炭素数6~18個の脂肪酸のジ-およびモノグリセリドから選ばれる少なくとも1種の脂肪乳剤基剤 : 5~20% (w/v)、(c) リン脂質である乳化剤 : 0.6~2.4% (w/v)、(d) グリセリンである等強化剤、および(e) 水を含む、平均粒子径が1ミクロン以下である慢性関節リウマチ治療剤としてのプロスタグランジンE1含有脂肪乳剤。

【請求項4】 プロスタグランジンE1 (PGE1) の有効投与量、およびPGE1の作用を相乗的に発現し得るに足るホスフォジエステラーゼ (Phosphodiesterase) 阻害剤の有効投与量の両者を併用することを特徴とする慢性関節リウマチ治療剤単位。

【請求項5】 プロスタグランジンE1 (PGE1) と共に併用されるホスフォジエステラーゼ (Phosphodiesterase) 阻害剤がベントキシフィリンである請求項4に記載の慢性関節リウマチ治療剤単位。

【請求項6】 プロスタグランジンE1 (PGE1) の有効投与量として、請求項2または3に記載の慢性関節リウマチ治療剤を用いる請求項4または5に記載の慢性関節リウマチ治療剤単位。

【請求項7】 プロスタグランジンE1 (PGE1) の抗リウマチ作用に対する増強剤としてのホスフォジエステラーゼ (Phosphodiesterase) 阻害剤。

【請求項8】 ベントキシフィリンを有効成分とするプロスタグランジンE1 (PGE1) の抗リウマチ作用増強剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は慢性関節リウマチ治療剤に関し、詳細にはプロスタグランジンE1 (PGE1) を有効成分とする慢性関節リウマチ治療剤に関する。更にまた本発明は、PGE1と共にPGE1の抗リウマチ作用を相乗的に増強させる作用を有するホスフォジエステラーゼ (Phosphodiesterase) 阻害剤を併用してなる慢性関節リウマチ治療剤にも関する。

【0002】

【従来の技術及びその問題点】 アスピリンの鎮痛解熱作用が、アラキドン酸代謝経路のシクロオキシゲナーゼ (COX) 阻害作用を介するプロスタグランジンE2 (PGE2) 産生の抑制によることが明らかにされたことより、COX阻害薬はカラゲニン浮腫などの急性炎症モデルを抑制することから、抗炎症薬に分類されるよう

になった。それ以来PGE2は、急性炎症の起炎物質の一つとして考えられるようになり、PGE2の産生を特異的に抑制するCOX阻害剤が、非ステロイド性抗炎症薬 (NSAID) として多量に開発され、多くの炎症性疾患の治療に使用されてきている。慢性関節リウマチ (RA : 以下単にRAと記す場合もある) においても、関節炎局所にPGE2が産生されるため、その産生抑制を目的にNSAIDの投与が行われてきている。しかしながらNSAIDは、慢性関節リウマチ患者の朝のこわばり、関節痛を軽減するものの、関節炎による関節破壊、変形の進行を抑制する効果はなく、赤沈、CRPなどの関節炎の指標を改善しない。すなわちNSAIDには基本的には抗リウマチ作用はないものである。

【0003】 現在、慢性関節リウマチの治療薬の中心は、抗リウマチ作用を有するとされる注射金製剤あるいは内服金製剤であるオーラノフィン、さらにはメトトレキサート (MTX)、サラゾピリン、プシラミンなどである。しかしながら、かかる抗リウマチ薬もその有効率は60%未満であり、重篤な副作用が高頻度に見られる問題点を有する。したがって、より効果が優れ、副作用等の問題がない抗リウマチ薬の開発が強く望まれているのが現状である。

【0004】 一方PGE2には、*in vitro*において種々の抗免疫作用、抗炎症作用が認められている。すなわち、T細胞の増殖とインターロイキン-2 (IL-2) 産生の抑制、B細胞の活性化と増殖の抑制、単球/マクロファージの活性化と炎症性サイトカイン産生の抑制などである。しかし、PGE2が抗リウマチ作用を発揮するかどうかの検討は、1971年以来行われていない。すなわち1971年にニューヨーク大学のZurierらは、RAの動物モデルであるラットの関節炎に超大量のプロスタグランジンE1 (PGE1) を投与し、その有効性の検討を報告している。この報告では、500 μ gのPGE1皮下注射を1日2回、連日投与したが、投与後に一過性のショック、意識障害等が認められており、またヒトにおいてこのような大量投与は困難なため、臨床応用には至らなかった。したがって、PGE1自体にRA特有の病態を抑制する抗リウマチ作用があるか否かはまったく不明なものであった。

【0005】 他方1983年に水島らは、脂肪乳剤中の脂肪小粒子 (リピッドマイクロソフェア) 中にPGE1を封入した (包埋した) *liposome*-PGE1 (脂肪乳剤PGE1) を開発している。この*liposome*-PGE1は、1日10 μ gの投与により閉塞性動脈硬化症などの末梢循環障害に有効であった。*liposome*-PGE1は、PGE1を脂肪乳剤化したことにより脂肪小粒子が病巣部局所に選択的に取り込まれ、その場で封入されたPGE1が効果を発現することが示され、PGE1のターゲティング療法薬として種々の循環障害の治療に使用されている。しかしながら、まだRAに対する*liposome*-P

GE1の治療効果の検討は、*in vitro*でも*in vivo*でも全く試みられていないのが現状である。

【0006】本発明者らは上記の実状に鑑み、ここ数年RAに対する有効な治療剤の開発検討を行ってきたが、その検討の過程でプロスタグランジンの中でも、プロスタグランジンE (PGE) が有する特異的作用に着目した。すなわち、慢性関節リウマチの関節炎局所においては、PGEはリウマチの病態を抑制するための生体防御反応因子の一つではないかと考えられ、PGEのなかでも特にPGE1にはRAに対する特異的な治療効果があるのではないかと考えられた。したがってその点からみれば、抗リウマチ作用が認められないNSAIDをRA患者に投与することは、逆にPGE産生を抑制することになり、かえってRAの病態を増悪するのではないかといえる。また、PGEがリウマチの病態を抑制するための生体防御反応因子の一つであるならば、水島らが提案したターゲティング療法を応用してPGE1の充分量を関節炎局所に導入できれば、RAの病態抑制、および治療が可能となるのではないかと考え検討を加えた。

【0007】ところで本発明者らは、慢性関節リウマチの滑膜炎を*in vitro*で効率よく再現する細胞モデルを開発し、この点についてはすでに特許出願を行なっている。この細胞培養系では、RAに特徴的な滑膜細胞の増殖、炎症性サイトカインの産生、トランスフォーム型線維芽細胞の増生、パンヌス様組織の形成が再現される。すなわちこの系は、*in vitro*ヒト滑膜炎モデル、すなわち慢性間接リウマチの*in vitro*での病態モデルといえるものである。

【0008】そこで本発明者らは、上記の検討を行なうにあたり本発明者らが提案した細胞モデルを用い、この*in vitro*ヒト滑膜炎モデルに対するPGE1の効果を検討した。あわせて、RAの動物モデルであるII型コラーゲン関節炎マウスにPGE1脂肪乳剤 (lip oPGE1) を投与して、そのターゲティング療法に基づく治療効果をも検討した。その結果、PGE1は*in vitro*および*in vivo*において抗リウマチ作用が認められ、特にPGE1の脂肪乳剤にはより優れた抗リウマチ作用があることを新規に見だし、本発明を完成させたのである。

【0009】ところで、このPGE1が所有する多種多様な生物活性は、主に細胞内のサイクリックAMP (cyclicAMP) の濃度を上昇させることによって発揮されていることが知られている。したがって、細胞内cyclicAMP濃度を高レベルに維持し得る状況のもとでは、PGE1の生物活性がより効果的に発揮でき得ることが考えられる。事実、ペントキシフィリンなどのホスホジエステラーゼ (Phosphodiesterase) 阻害剤は、cyclicAMPの代謝を阻害して、いったん上昇した細胞内cyclicAMP濃度を長時間維持するものであり、この両者を併用して投与すればその生物活性が相乗的に増強されるこ

とが知られており、臨床的にはPGE1の血管内皮細胞、血小板に対する作用が注目されており、脳循環改善、末梢循環改善のために両者の併用療法が応用されてきている。

【0010】一方ペントキシフィリン自体の抗リウマチ作用も検討されており、その大量投与 (例えば、1, 600mg/日) により、慢性関節リウマチ患者の半数に有効であったとの報告もなされている。しかしながら、かかる大量投与による治療法では当然のことながら消化器症状等の副作用が問題となり、その後は臨床的には応用されていない状況である。この点からみれば、ペントキシフィリン単独での抗リウマチ作用に基づく実用的慢性関節リウマチ治療剤の開発は不可能な現状下にある。そこで本発明者らは、かかるペントキシフィリンのホスホジエステラーゼ阻害作用に着目した。すなわち、ペントキシフィリンを抗リウマチ作用を示さない投与量でPGE1と共に併用投与した場合には、細胞内のcyclicAMPが高レベルに維持でき、その結果、前記したPGE1の抗リウマチ作用が相乗的に増強されることを新たに確認し、本発明を完成させたのである。

【0011】

【発明が解決しようとする課題】したがって、本発明はより効果が優れ、副作用等の問題がない抗リウマチ薬を提供することを課題とする。

【0012】

【課題を解決するための手段】かかる課題を解決するための本発明は、そのひとつの目的として、プロスタグランジンE1 (PGE1) を有効成分とする慢性関節リウマチ治療剤を提供するものである。さらに本発明は、その具体的態様において、PGE1を脂肪乳剤の形態にした慢性関節リウマチ治療剤を提供する。

【0013】ところで、PGE1の脂肪乳剤はすでに水島らにより提案され、閉塞性動脈硬化症などの末梢循環障害の治療に使用されている製剤であるが、このものに抗リウマチ作用があることはなんら知られていなかったものである。したがって本発明の別の目的は、慢性関節リウマチ治療剤としてのPGE1含有脂肪乳剤の提供にあり、具体的には、(a) プロスタグランジンE1 (PGE1) : 0.001~0.01% (w/v)、(b) 植物油、炭素数6~12個の中鎖脂肪酸のトリグリセリドならびに炭素数6~18個の脂肪酸のジ-およびモノグリセリドから選ばれる少なくとも1種の脂肪乳剤基剤 : 5~20% (w/v)、(c) リン脂質である乳化剤 : 0.6~2.4% (w/v)、(d) グリセリンである等張化剤、および(e) 水を含有し、平均粒子径が1ミクロン以下である、慢性関節リウマチ治療剤としての、プロスタグランジンE1含有脂肪乳剤を提供する。

【0014】本発明においてPGE1をリビッドマイクロスフェア中に封入する脂肪乳剤自体については、すでにいくつかの特許出願が行われており (例えば、特許

第1, 289, 054号)、またPGE1以外に種々の薬物、例えばフルルビプロフェン、4-ビフェニル酢酸などの消炎鎮痛剤、各種ステロイドあるいはSOD等を封入した脂肪乳剤も提案されている(例えば、特許第1, 921, 169号: 特開昭61-44809)。この場合の脂肪乳剤は、一般的にその平均粒子径が1ミクロン以下のリピッドマイクロスフェア(脂肪小粒子)からなるものであり、その構成は、上記した如き植物油、炭素数6~12個の中鎖脂肪酸のトリグリセリドならびに炭素数6~18個の脂肪酸のジ-およびモノグリセリドから選ばれる少なくとも1種の脂肪乳剤基剤、リン脂質である乳化剤、グリセリンである等張化剤、および水を基本的構成とするものであり、その各成分の配合比率も上記の各数字の範囲内にある。したがって、本発明の慢性関節リウマチ治療剤としてPGE1を包埋する脂肪乳剤もかかる一般的な構成からなる脂肪乳剤であり、各成分の具体的な例示は、これら先行する特許出願明細書中に記載されるものが適用され、該明細書は本明細書の一部として包含される。

【0015】本発明が提案する慢性関節リウマチ治療剤としての、プロスタグランジンE1(PGE1)含有脂肪乳剤としては、前記した如くすでに閉塞性動脈硬化症などの末梢循環障害の治療に使用されているlipop-PGE1(脂肪乳剤PGE1)が好ましく使用されるが、なにもこのものに限定されず、PGE1の配合量を治療目的に応じ種々変化させることができ、それに合わせた脂肪乳剤組成により目的とするRA治療剤としてのPGE1含有脂肪乳剤とすることができる。すなわち、本発明において慢性関節リウマチ治療のために使用されるPGE1は、慢性関節リウマチの症状によって、あるいはその投与手段によってその用量を決定するのが好ましく、先に例示した先行特許明細書中に例示される具体的各成分を適宜組み合わせ、かかる用量が投与でき得る所望のPGE1含有脂肪乳剤を調製し得ることはいうまでもない。

【0016】また本発明は、更に別の目的として、プロスタグランジンE1(PGE1)の有効投与量、およびPGE1の作用を相乗的に発現し得るに足るホスホジエステラーゼ(Phosphodiesterase)阻害剤の有効投与量の両者を併用することを特徴とする慢性関節リウマチ治療剤単位を提供する。

【0017】この場合のPGE1の有効投与量と共に併用投与されるホスホジエステラーゼ阻害剤としてはペントキシフィリンが取り分け好ましいことが判明した。したがって、本発明は別の態様として、PGE1の抗リウマチ作用に対する増強剤としてのホスホジエステラーゼ(Phosphodiesterase)阻害剤を提供するものであり、更に好ましい態様として、ペントキシフィリンを有効成分とするPGE1の抗リウマチ作用増強剤を提供するものである。なおこの場合の慢性関節リウマチ治療剤

単位として、PGE1の有効投与量を投与する形態は特に限定はされないが、先に説明したPGE1含有脂肪乳剤の形態で投与することができる。

【0018】一方ペントキシフィリンに代表されるホスホジエステラーゼ阻害剤を併用する場合の投与量としては、このもの単独投与では抗リウマチ作用を発揮しない低用量で十分であり、かかる低用量のペントキシフィリンをPGE1と共に併用することにより強力な抗リウマチ作用をもち、かつ副作用の少ない慢性関節リウマチ治療剤単位が提供されるのである。

【0019】以下に本発明の有効成分であるPGE1の具体的な抗リウマチ作用の詳細、ならびにホスホジエステラーゼ阻害剤としてのペントキシフィリンとの併用投与における抗リウマチ作用の詳細を記載することにより本発明を説明する。

【0020】1: in vitroにおけるPGE1の効果: 本発明者らがすでに特許出願を完了している、抗リウマチ薬の薬効評価のためのin vitroヒト滑膜炎モデルを用いてPGE1の効果を検討した。

方法: 慢性関節リウマチ患者の滑膜切除術または人工関節置換術施行時に得られた滑膜組織を細切し、10%FCSまたは5%ヒトAB血清を含むRPMI-1640培地で培養した。培養開始後3ないし5日目に浮遊細胞を回収し、 $1 \sim 2 \times 10^6 / \text{ml}$ の濃度で初代混合培養する。経時的にその培養形態の観察ならびに培養上清中のサイトカイン産生量の測定を行った。なお、サイトカインの測定はELISAキットを用いた。増殖反応は、MTTアッセイ法を用いた。

【0021】結果:

(1) PGE1は滑膜細胞の増殖を抑制することが確認された。滑膜細胞を基礎培地に種々の濃度のPGE1存在下あるいは非存在下で4日から9日間培養後、MTTアッセイ法により増殖反応を測定した。その結果を図1として示す。図1-aは4日目のものであり、図1-bは6日目のものを示し、図1-cは9日目のものを示す。図中の結果から明らかなように、PGE1およびPGE2はともに、 $0.01 \mu\text{M}$ から $1 \mu\text{M}$ の濃度において用量依存性に滑膜増殖を抑制していることが理解される。一方、これに対してPGE合成阻害薬のインドメタシン存在下では、逆に滑膜増殖は増強された。その結果を図2として示す。

【0022】(2) PGE1は滑膜細胞によるTNF α 産生を抑制することが確認された。滑膜細胞を基礎培地に培養すると培養上清にはTNF α が産生された。このTNF α 産生量は、PGE1またはPGE2存在下では抑制され、インドメタシン存在下で増強した。これらの結果を図3として示す。

【0023】(3) PGE1は滑膜細胞によるin vitroでの組織形成を抑制することが確認された。in vitroで滑膜炎組織を再現するヒト細胞モデル

に対するPGEの抑制効果を検討した。すなわち、培養後の形態的变化を半定量的に表すため、以下のように点数化した。

細胞の集簇と空白域の出現： 1点
細胞外マトリクスの出現： 2点
マトリクス内への多層性細胞集簇： 3点
肉眼的観察可能な組織形成： 4点
培養皿3穴の点数の平均値を組織化スコアとした。

【0024】その形態変化の状態を図4として示す。図中に示したように、基礎培地のみで培養した対照群では1.5週後には形態変化が進み、3.5週後には肉眼的観察可能な組織を形成した。この組織形成は、PGE1またはPGE2の0.2μMの存在下で抑制された。このPGE1の抑制作用を、PGE1を0.001μM、0.01μM、0.1μMおよび1μMと濃度変化させ、検討した結果を図5として示す。図5の結果から明らかなように、PGE1の抑制作用は用量依存性であることが確認された。また、PGE1を0.002μM、0.02μMおよび0.2μMと濃度変化させ、PGE1の抑制作用をインドメタシン0.1μMの効果とあわせて検討した結果を図6として示す。図中の結果から明らかなように、PGE1は用量依存的に抑制しているのに対し、PGE合成阻害薬のインドメタシンは逆に組織形成を増強している。これら(1)～(3)の結果は、PGE1は*in vitro*において抗リウマチ作用を示していることを如実に示している。

【0025】II: *in vivo*におけるPGE1の効果：II型コラーゲン関節炎は、6週齢の雄のDBA/1Jマウスを用いて、文献記載の従来の方法で作製した。方法：まず、第1日目にII型コラーゲン100μgを完全フロインドアジュバントに混ぜてマウス尾根部皮下に注射した。第21日目にII型コラーゲン50μgを不完全フロインドアジュバントに混ぜて皮下注射した。第25日にマウスを無作為に4群に分け、A群には閉塞性動脈硬化症などの末梢循環障害の治療に使用されている市販のlipo-PGE1の100μl (0.5μg)を、B群には対照として脂肪乳剤のイントラファット(lipo-PGE1の担体)100μlを、C群には生理食塩水100μlをそれぞれ尾静脈に10日間連日静注した。

【0026】関節炎の評価は、発症率と重症度を1日おきに判定した。発症率は、(発症した四肢の数/1群マウス肢数)であらわし、重症度は、各肢について、
無変化・・・・・・・・・・0点
1指あるいは複数指の腫脹・・・・・・・・1点
全体にみられる発赤と腫脹・・・・・・・・2点
全体にみられる強度の腫脹・・・・・・・・3点
関節の強直性変化を伴うもの・・・・・・・・4点
の点数化を行い、四肢の合計を16点とし、マウス1匹当たりの平均スコアで表した。

【0027】結果：

(1) II型コラーゲンで免疫したDBA/1Jマウスに第21日追加免疫して関節炎を発症させ、第25日よりlipo-PGE1の100μl (0.5μg)を10日間連日静脈注射した。lipo-PGE1投与中のマウスの関節炎発症率は、対照の脂肪乳剤または生理食塩水を投与中のマウスと比較して低かった。その結果を図7として示す。また、関節炎の重症度も低かった。その結果を図8として示す。図7および図8の結果から明らかなように、lipo-PGE1の治療終了後(免疫後35日以降)、関節炎の発症率は増加して他の群と差がなくなった(図7)が、関節炎の重症度は増加しなかった(図8)。この点からみればlipo-PGE1の治療効果は、投与中止後少なくとも10日間持続していることが理解される。

【0028】(2) II型コラーゲンで同様に関節炎を発症させたDBA/1Jマウス48匹を無作為に12匹ずつ4群に分け、第25日よりlipo-PGE1またはメトトレキサート(MTX)0.3mg/kgを2週間連日静脈内投与した結果を図9として示す。関節炎の重症度は、対照群と比較してlipo-PGE1の200μl (1μg)投与群で有意に低いものであることが理解される。この点は、lipo-PGE1の50μl (0.25μg)投与群でも重症度の低い傾向が認められた。これに対して抗リウマチ薬MTX投与群では、対照群と重症度に差が認められなかった(図9)。以上の結果から、PGE1は*in vivo*においても優れた抗リウマチ作用を発揮し、特に脂肪乳剤としたlipo-PGE1で優れた効果を示していることが理解される。

【0029】III: *in vitro*におけるcyclicAMP上昇薬の効果：上記Iと同様に、本発明者らがすでに特許出願を完了している、抗リウマチ薬の薬効評価のための*in vitro*ヒト滑膜炎モデルを用いてcyclicAMP上昇薬の効果を検討した。

方法：慢性関節リウマチ患者の滑膜切除術または人工関節置換術施行時に得られた滑膜組織を細切し、10%FCSまたは5%ヒトAB血清を含むRPMI-1640培地で培養した。培養開始後3ないし5日目に組織逸脱細胞を回収し、 $1\sim 2\times 10^6$ /mlの濃度で初代混合培養する。経時的にその培養形態の観察ならびに培養上清中のサイトカイン産生量の測定を行った。なお、サイトカインの測定はELISAキットを用いた。増殖反応は、MTTアッセイ法を用いた。

【0030】結果：

(1) 細胞膜透過性cyclicAMPであるジブチリルサイクリックAMP (dibutyl-cyclicAMP：以下、db-cAMP)は、PGE1と同様に滑膜細胞の増殖を抑制することが確認された。滑膜細胞を基礎培地に種々の濃度のdb-cAMPまたはPGE1の存在下あるいは非存在

下で6日間培養後、MTTアッセイ法により増殖反応を測定した。その結果を図10として示す。図10(a)はdb-cAMPのものを示し、図10(b)はPGE1のものを示す。図中の結果から明らかなように、db-cAMPは、1 μ Mから100 μ Mの濃度において用量依存的に滑膜細胞の増殖を抑制していることが理解される。

【0031】(2) 細胞膜透過性cyclicAMPであるdb-cAMPは、PGE1と同様にTNF α の産生を抑制することが確認された。滑膜細胞の培養上清に産生されるTNF α は、PGE1と同様に、db-cAMP存在下で用量依存的に抑制されていることが判明する。これらの結果を図11に示す。なお、図11(a)はdb-cAMPの結果を、図11(b)はPGE1の結果を示す。

【0032】(3) 細胞膜透過性cyclicAMPであるdb-cAMPは、PGE1と同様に滑膜細胞によるin vitro組織形成を抑制することが確認された。in vitroでの滑膜炎組織の形態変化を半定量的に示すために、上記Iの検討で記載したものと同様の点数化を行った。なお、培養皿2穴の点数の平均値を組織化スコアとした。その結果を図12に示した。図中の結果からも明らかなように、基礎培地のみで培養した対照群では、1週間後には形態変化が進み、2週間後には肉眼的観察可能な組織を形成した。この組織形成は、db-cAMP存在下で用量依存的に抑制されていることが判明する。以上の(1)ないし(3)の結果から判断すると、細胞内のcyclicAMP濃度を上昇させることによりPGE1の抗リウマチ作用が再現されることが確認される。

【0033】IV: in vitroにおけるペントキシフィリンの抗リウマチ効果: 上記IIIの方法と同様にして、ペントキシフィリンの抗リウマチ作用を検討した。
結果:

(1) ペントキシフィリンは、30 μ g/mlの濃度で滑膜細胞の増殖を抑制することが確認された。滑膜細胞を基礎培地に種々の濃度のペントキシフィリンの存在下あるいは非存在下で6日間培養後、MTTアッセイ法により増殖反応を測定した。その結果を図13として示す。図中の結果からも明らかなように、ペントキシフィリンは、30 μ g/mlの濃度で滑膜細胞の増殖を抑制したが、3 μ g/ml以下の濃度では抑制しないことが理解される。

【0034】(2) ペントキシフィリンは、10 μ g/mlの濃度でTNF α の産生を約30%抑制することが確認された。滑膜細胞の培養上清に産生されるTNF α は、ペントキシフィリンの10 μ g/mlの濃度で約30%抑制されており、3 μ g/mlの濃度ではその抑制率は20%以下とわずかなものであることが判明した。これらの結果を図14として示す。

【0035】(3) ペントキシフィリンは、3 μ g/ml以上の濃度で滑膜細胞によるin vitro組織形成を抑制することが確認された。滑膜細胞によるin vitro

での組織形成に対するペントキシフィリンの効果、上記III-(3)と同様に検討した。図15に培養3週間後の組織形成の平均スコアを示した。図中に示されたように、ペントキシフィリンは用量依存的に滑膜細胞によるin vitro組織形成を抑制したが、その有意な抑制のためには3 μ g/ml以上の濃度が必要であることが判明する。以上の(1)ないし(3)の結果から判断すると、ペントキシフィリンの抗リウマチ作用は、少なくとも3 μ g/ml以上の濃度を必要とするものであることが示された。

【0036】V: in vitroにおけるPGE1とペントキシフィリンの相乗的抗リウマチ効果: 上記のIVの試験結果からは、ペントキシフィリンの抗リウマチ作用が発現される濃度は、少なくとも3 μ g/ml以上であることが判明したので、ペントキシフィリンが抗リウマチ作用を示さない低濃度でPGE1と併用投与した場合における、ペントキシフィリンのPGE1の抗リウマチ作用に対する増強効果を検討した。試験方法は、上記IIIに記載した方法と同様に行った。

【0037】結果:

(1) 低濃度のペントキシフィリンは、PGE1の滑膜細胞の増殖抑制作用を増強することが確認された。滑膜細胞を基礎培地にペントキシフィリン1 μ g/mlと種々の濃度のPGE1の存在下あるいは非存在下で6日間培養後、MTTアッセイ法により増殖反応を測定した。その結果を図16として示す。なお、図中の略記号POFはペントキシフィリンを意味し、したがってw/o POFはペントキシフィリンの非存在下、w/POFはペントキシフィリンの存在下であることを意味する(以下の図において同じ)。図中の結果から明らかなように、ペントキシフィリンが抗リウマチ作用を示さない1 μ g/mlの低濃度において、PGE1の滑膜細胞の増殖抑制作用が増強されていることが判明する。

【0038】(2) 低濃度のペントキシフィリンは、PGE1のTNF α の産生抑制作用を増強することが確認された。滑膜細胞の培養上清に産生されるTNF α は、PGE1により抑制されたが、この抑制作用は、ペントキシフィリン1 μ g/ml存在下で更に増強されていることが判明した。その結果を図17として示す。

【0039】(3) 低濃度のペントキシフィリンは、PGE1のTNF α の滑膜細胞によるin vitro組織形成抑制作用を増強することが確認された。上記III-(3)と同様の方法により、低濃度のペントキシフィリンと低濃度のPGE1の併用による、滑膜細胞によるin vitroでの組織形成に対する効果を検討した。図18に培養3週間後の組織形成の平均スコアを示した。図中に示されたように、ペントキシフィリン1 μ g/mlではほとんど抑制されていない(抗リウマチ作用を示していない)。またPGE1の2 nM濃度では軽度抑制されただけであった。しかしながらこの両者の併

用により *in vitro* 組織形成は顕著に抑制されており、低濃度のペントキシフィリンはPGE1の抗リウマチ作用を相乗的に増強していることが理解される。

【0040】

【発明の効果】以上のように、本発明はこれまで検討されていなかったPGE1について初めて *in vitro* および *in vivo* における抗リウマチ作用を確認したものであり、かかる作用に基づき、PGE1を有効成分とする抗リウマチ薬を提供する点で特異的なものである。加えて、PGE1を脂肪乳化化することにより、ターゲティング療法が可能となり、より優れた抗リウマチ薬が提供される利点がある。更に、このPGE1の抗リウマチ作用は細胞内cyclicAMP上昇を介したものであり、ペントキシフィリンなどのホスホジエステラーゼ (Phosphodiesterase) 阻害剤の低濃度の併用によりその作用は相乗的に増強されることが明らかとなった。かかる特異的相乗効果を有する慢性関節リウマチ治療剤単位は副作用のない、まったく新しい治療剤を提供するものである。したがって、これまで有効な治療薬がなかった慢性リウマチ患者の治療に対して大きな光明を与えるものである。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明のPGE1およびPGE2の滑膜細胞増殖に対する *in vitro* での効果を示す図である。1-aは4日目の結果を、1-bは6日目の結果を、1-cは9日目の結果を示す。

【図2】本発明のPGE1とインドメタシンの両者の滑膜細胞増殖に対する *in vitro* での効果を示す図である。

【図3】本発明のPGE1とインドメタシンのTNF α 産生抑制の *in vitro* での効果を示す図である。

【図4】本発明のPGE1の滑膜細胞の *in vitro* での組織形成に対する効果を示す図である。

【図5】本発明のPGE1の滑膜細胞の *in vitro* での組織形成に対する効果を、濃度を変えて観察した結果を示す図である。

【図6】本発明のPGE1とインドメタシンの滑膜細胞

の *in vitro* での組織形成に対する効果を、濃度を変えて観察した結果を示す図である。

【図7】本発明のlipo-PGE1の効果を *in vivo* で観察し、その関節炎の発症率の結果を示す図である。

【図8】本発明のlipo-PGE1の効果を *in vivo* で観察し、その関節炎の重症度の結果を示す図である。

【図9】本発明のlipo-PGE1とMTXの効果を *in vivo* で観察し、その関節炎の重症度の結果を示す図である。

【図10】本発明のPGE1およびdb-cAMPの滑膜細胞増殖に対する *in vitro* での効果を示す図である。10-aはdb-cAMPの結果を、10-bはPGE1の結果を示す。

【図11】本発明のPGE1およびdb-cAMPのTNF α の産生抑制の *in vitro* での効果を示す図である。11-aはdb-cAMPの結果を、11-bはPGE1の結果を示す。

【図12】db-cAMPの滑膜細胞の *in vitro* での組織形成に対する効果を示す図である。

【図13】ペントキシフィリンの滑膜細胞増殖に対する *in vitro* での効果を示す図である。

【図14】ペントキシフィリンのTNF α の産生抑制の *in vitro* での効果を示す図である。

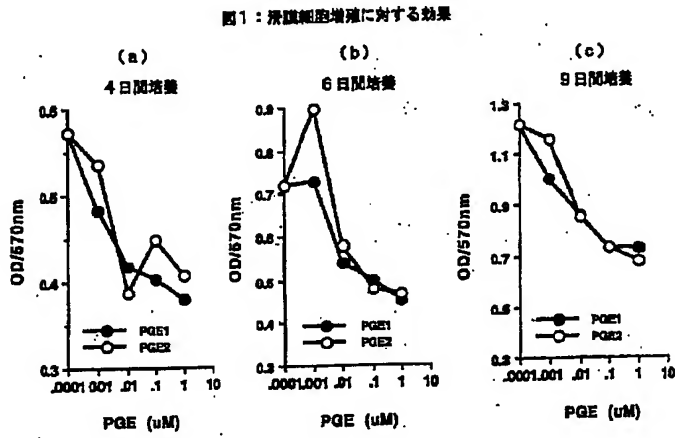
【図15】ペントキシフィリンの滑膜細胞の *in vitro* での組織形成に対する効果を示す図である。

【図16】本発明のPGE1および低濃度でのペントキシフィリンの併用による滑膜細胞増殖に対する *in vitro* での効果を示す図である。

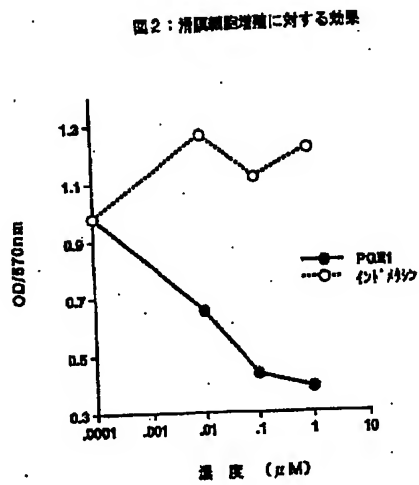
【図17】本発明のPGE1および低濃度でのペントキシフィリンの併用によるTNF α の産生抑制の *in vitro* での効果を示す図である。

【図18】本発明の低濃度でのPGE1およびペントキシフィリンの併用による滑膜細胞の *in vitro* での組織形成に対する効果を示す図である。

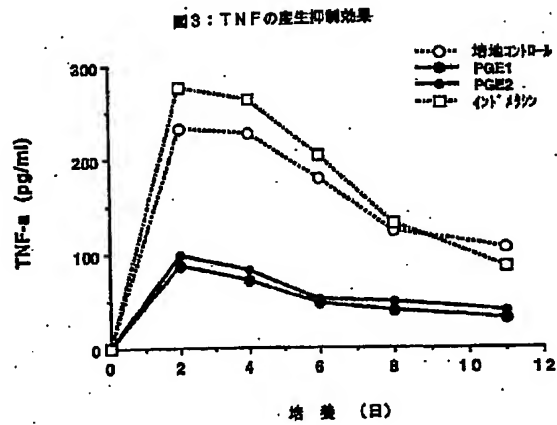
【図1】



【図2】

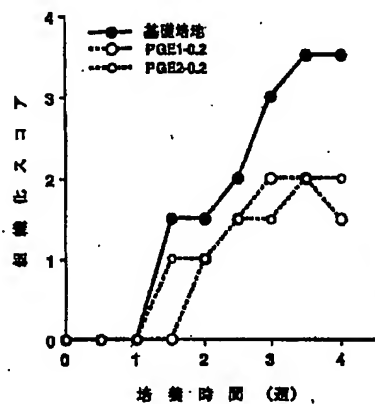


【図3】



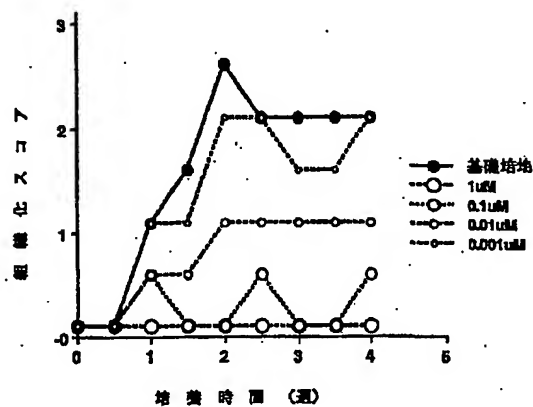
【図4】

図4：滑膜細胞の組織形成変化



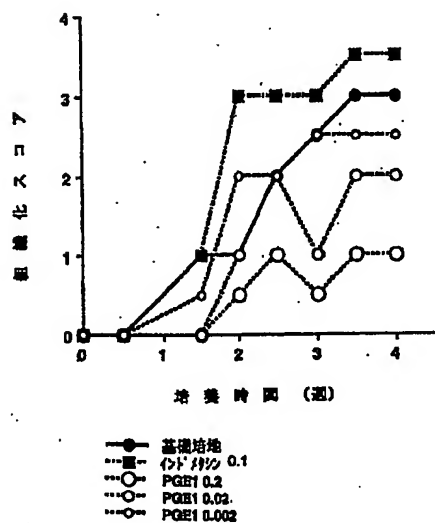
【図5】

図5：滑膜細胞の組織形成変化



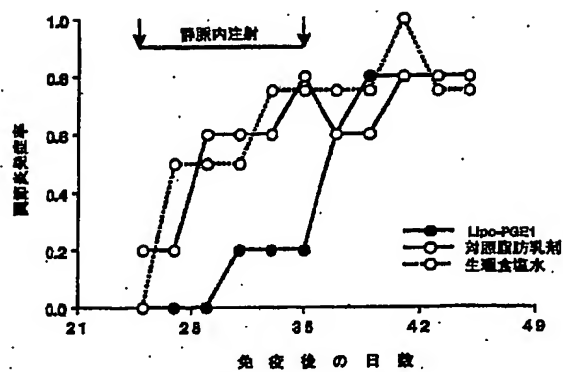
【図6】

図6：滑膜細胞の組織形成変化



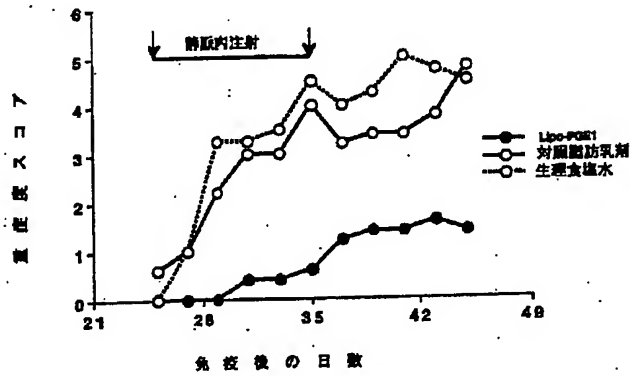
【図7】

図7：関節炎の発症率の結果



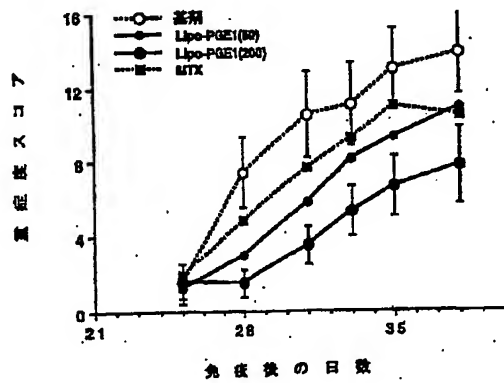
【図8】

図8：関節炎の重症度の結果



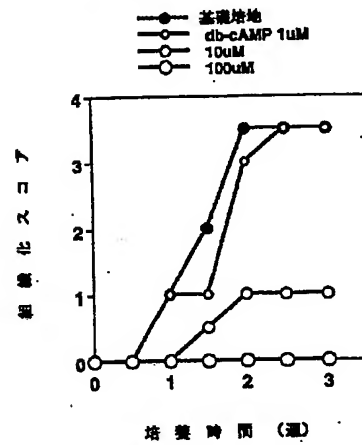
【図9】

図9：関節炎の重症度の結果



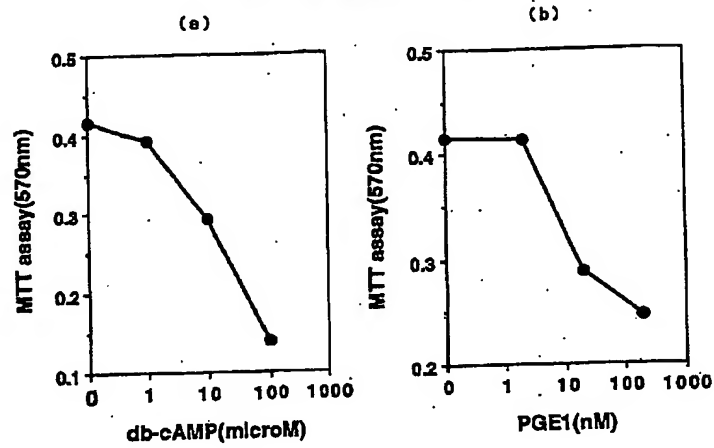
【図12】

図12：滑膜細胞の組織形成変化



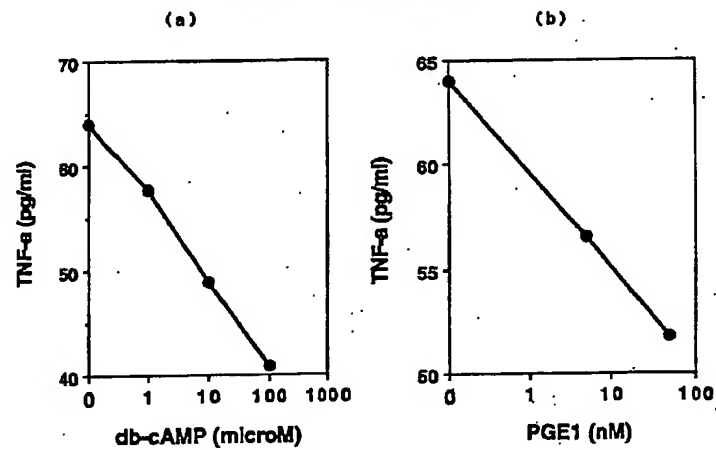
【図10】

図10：滑膜細胞増殖に対する効果

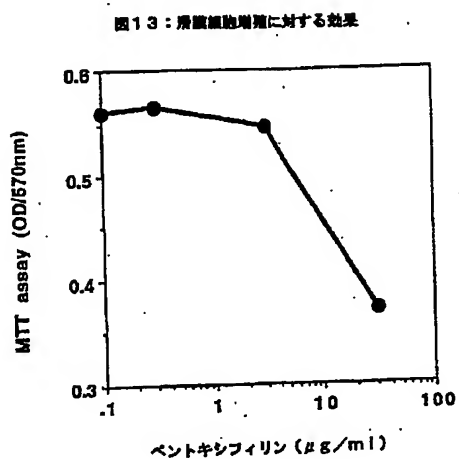


【図11】

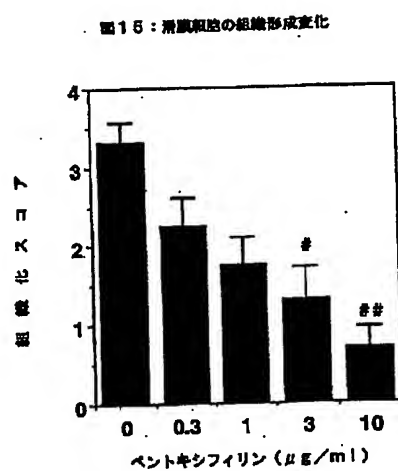
図11：TNFの産生抑制効果



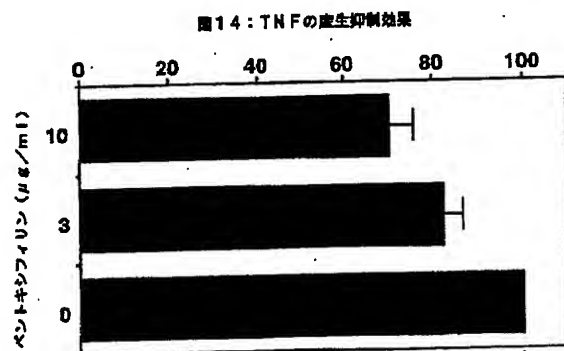
【図13】



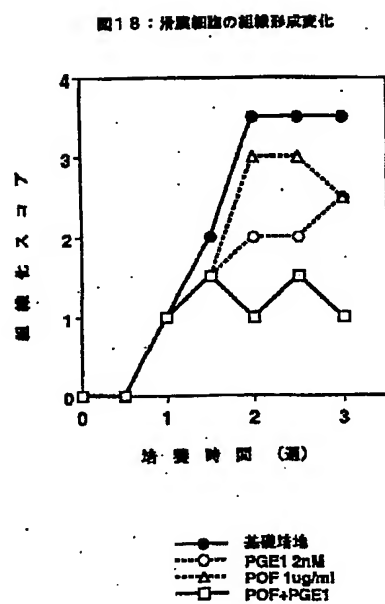
【図15】



【図14】

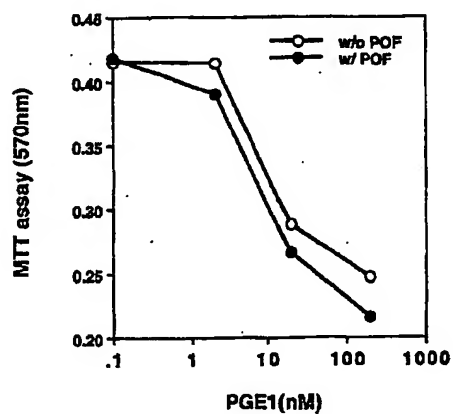


【図18】



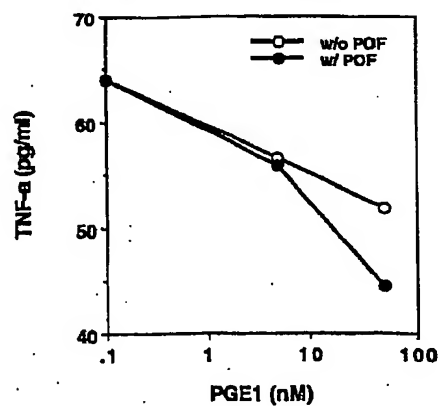
【図16】

図16：尿管細胞増殖に対する効果



【図17】

図17：TNFの産生抑制効果



THIS PAGE BLANK (USPTO)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)